Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
Kommissarische Direktoren:
Prof. Dr. med. J. Dittrich
Prof. Dr. med. U. Willenbockel

ENTSTEHUNG CYTOPLASMATISCHER VAKUOLEN IN NEUTROPHILEN GRANULOCYTEN UNTER DEM EINFLUSS VON PROMETHAZIN UND UV-BESTRAHLUNG IM IN-VITRO VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

CHRISTA-MARIA REISS
aus Schermbeck / Rees

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
Kommissarische Direktoren:
Prof. Dr. med. J. Dittrich
Prof. Dr. med. U. Willenbockel

ENTSTEHUNG CYTOPLASMATISCHER VAKUOLEN IN NEUTROPHILEN GRANULOCYTEN UNTER DEM EINFLUSS VON PROMETHAZIN UND UV-BESTRAHLUNG IM IN-VITRO VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

CHRISTA-MARIA REISS
aus Schermbeck / Rees

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am .29.6.1979.

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr.med. Neurath
Referent: Prof.Dr.med.C.Eschenbach
Correferent: Prof.Dr.med.C.-P.Sodomann

Inhalt

I. Einleitung S. 4

II. Methode S. 6
1. Untersuchungsmaterial, Geräte S. 6
2. Untersuchte Gruppen S. 6
3. Untersuchungsgang S. 7

III. Ergebnisse S.12
1. Ingestion von Staphylokokken S.12
2. Zahl cytoplasmatischer Vakuolen S.12
3. Quotient cytoplasmatische Vakuolen/ ingestierte Staphylokokken S.12
4. Bestimmung der Gesamtvakuolenfläche S.13
5. Fläche der Einzelvakuole S.13
6. Flächenverteilung der cytoplasmatischen Vakuolen S.13
7. Morphologische Befunde S.21

IV. Diskussion S.23
1. Einfluß von Promethazin und UV-Exposition S.23
2. Eigene Ergebnisse S.28
3. Methode S.30

V. Zusammenfassung S.32

VI. Literaturverzeichnis S.33

VII. Lebenslauf S.37

VIII. Verzeichnis der akademischen Lehrer S.38

I. Einleitung

Ein wesentlicher Faktor der Erregerabwehr des Organismus ist die Phagocytose:
Die phagocytierenden Leukocyten bilden Pseudopodien, die den Erreger umschließen; es resultiert eine Invagination der Membran mit anschließender Abschnürung des Invaginationskanals nach innen. Auf diese Weise ist ein Heterophagosom entstanden, das vom Cytoplasma der Zelle umflossen wird und neben dem noch vitalen Erreger extrazelluläres Medium enthält. Die Vakuolenmembran entspricht dabei der cytoplasmatischen Membran.
Es folgt nun die Abtötung und Digestion der phagocytierten Erreger. Dies geschieht u.a. mit Hilfe cytoplasmatischer Granula. Voraussetzung dazu ist die Bewegung dieser primären Lysosomen auf die Heterophagosomen zu und eine rasche Übertragung der lysosomalen Enzyme in die Heterophagosomen, ohne daß die Zelle selbst damit in Kontakt kommt und geschädigt wird. Dazu ist eine Fusion der Membranen der primären Lysosomen und der Heterophagosomen notwendig (Degranulation). Es hat sich so ein sekundäres Heterophagolysosom gebildet.
Durch die Wirkung der lysosomalen Hydrolasen kommt es sehr rasch zur Entstehung osmotisch wirksamer Spaltprodukte, die einen Flüssigkeitseinstrom aus der Umgebung und damit eine Volumenzunahme der Heterophagolysosomen zur Folge haben. Diese sind nun lichtmikroskopisch als cytoplasmatische Vakuolen erkennbar.

Es wurden verschiedene Hinweise gefunden dafür, daß die Fusion der primären Lysosomen mit den Heterophagosomen vom Stabilitätsgrad der beteiligten Membranen abhängt. Dieser wird durch zahlreiche

membranstabilisierende und -destabilisierende Einflüsse geprägt:
Einerseits spielen die Bedingungen des umgebenden Milieus wie pH, Temperatur und ionale Zusammensetzung eine Rolle. Zum anderen wurde von verschiedenen Autoren im in-vitro und in-vivo Versuch gezeigt, daß u.a. Streptolysine, Pyrogene, Endotoxin, Lysolecithin, Detergentien und UV-Exposition membrandestabilisierend wirken, während Cortisol, Cortison, Chloroquin und Phenothiazinderivate einen stabilisierenden Effekt haben.
Bezüglich der biochemischen Vorgänge während der Membrandestabilisierung findet man Indizien für eine Lipidperoxidation der Membranen der am Fusionsprozeß beteiligten Organellen. Auch UV-Licht und Promethazin beeinflussen wahrscheinlich u.a. über die Lipidperoxidation die Membranstabilität.

In der vorliegenden Arbeit wurde in in-vitro-Phagocytoseversuchen mit Staphylokokken an Neutrophilen Granulocyten (NG) im Vollblut die Abhängigkeit der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen von der Einwirkung von UV-Licht und Promethazin untersucht. Die Bildung der cytoplasmatischen Vakuolen wurde dabei als Ausdruck stattgehabter Fusion zwischen Lysosomen- und Heterophagosomenmembran und somit einer Membrandestabilisierung gedeutet. Es wurden Zahl und Gesamtfläche der Vakuolen pro Zelle beurteilt. Natürlicherweise besteht eine Abhängigkeit zwischen der Bildung cytoplasmatischer Vakuolen und der Ingestion. Es mußte daher das Ausmaß der Ingestion von Staphylokokken (Staph.) bei der Beurteilung der genannten Parameter berücksichtigt werden.

II. Methode

1. Untersuchungsmaterial, Geräte

- 8 ml-Polystyrolröhrchen, 84 mm, Innendurchmesser 14 mm (Sarstedt, Nümbrecht; Best.nr. 8414)
- silikonisierte 8 ml-Quarzröhrchen, 84 mm, Innendurchmesser 13,5 mm (Ott, Marburg)
- Quecksilber-Hochdruckbrenner Q 81 (Original Hanau ; U_B = 72 V, I_B = 1,15 A, B_B = 70 W) Abstand der Röhrchen von der Strahlungsquelle: 40cm
- Teilchengrößenanalysator TGZ 3 (Carl Zeiss)
- Heparin (Hoffmann/LaRoche AG, Basel), 158.2 IE/mg
- phosphatgepufferte 0,15 m NaCl-Lösung pH 7,2
- Promethazinum-HCl = Atosil-HCl^R Reinsubstanz (N-(2 Dimethylaminopropyl)phenothiazin-hydrochlorid) (Bayer/Leverkusen, Pt. 130367)
- Staphylokokkus aureus[1)], Stamm SG 511
  Die Vermehrung der Staphylokokken erfolgte in Glucose-Bouillon bei 37°C für die Dauer von 24 Stunden; anschließend Hitzeabtötung bei 65°C während 30 min; Endkonzentration: 10^{11} - 10^{12} Erreger / ml Suspension
  Die Bakteriensuspension wurde in 8 ml-Polystyrolröhrchen eingefroren und bei -14°C gelagert.

2. Untersuchte Gruppen

Die Untersuchungen wurden mit heparinisiertem Venenblut von 15 gesunden, infektfreien, in einem Zeitraum von vier Wochen vor Blutentnahme nicht geimpften Erwachsenen (Alter: 20-43 Jahre) durchgeführt. Die Infektfreiheit wurde durch

---

1) Ich danke Herrn Prof. Dr. W.Schiff, Hygiene-Institut der Universität Marburg, für die freundliche Überlassung der Staphylokokkensuspension.

subjektive Angaben der Versuchsperson, Zahl der Leukocyten im peripheren Blut, das Differentialblutbild und eine BSG (nach Westergren) gesichert.

3. Untersuchungsgang

a) Herstellung der Promethazinlösung
Zur Herstellung einer 1mm Lösung der Reinsubstanz Promethazin wurden 14,22 mg der Substanz (MG 284,4) in 50 ml 0,15m phosphatgepufferter NaCl-Lösung gelöst. Endkonzentration von Promethazin im Inkubat: 66,6µm entsprechend 0,1 ml der 1mm Lösung in 1,5 ml Ansatz

b) Aufbereitung der Bakteriensuspension
Die in Polystyrolröhrchen eingefrorene Bakteriensuspension wurde im Wasserbad von 30-35°C rasch aufgetaut. Nach zweimaliger Waschung der Bakteriensuspension durch 10 min Zentrifugieren bei 3000 U/min, Dekantieren und Resuspendieren in 2,5 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung und einer dritten Zentrifugation wurde das Sediment in 1,0 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung suspendiert (Staph-Susp).
Die Bestimmung der Staph.zahl/ ml Staph-Susp erfolgte durch 20-fache Verdünnung von 0,1 ml der Suspension mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung und Auszählen in der Neubauer-Zählkammer. Dabei ergab sich eine Staph.zahl von $1,8 - 4,4 \times 10^7$/ 0,01 ml Staph-Susp.
Die Suspension wurde vor jedem Versuch frisch aufbereitet.

c) Bestimmung der Zahl der NG
Im Kapillarblut der Versuchsperson wurde zur orientierenden Berechnung des Ansatzes die Zahl der NG bestimmt.

d) Ansatz
Unter Berücksichtigung der Zahl der NG im Vollblut der Versuchsperson und der Zahl der Staph.

in der Staph-Susp wurde bei Zugrundelegung von 1 ml Vollblut die Menge der zuzusetzenden Staph-Susp berechnet, um folgende Zahlen der Staph./NG im Ansatz zu erreichen: 10-20-30-40 mit der Ansatzbezeichnung A- B- C- D.

e) Durchführung der Ansätze

I = Kontrollgruppe
berechnete Volumina der Staph-Susp
+Volumenausgleich mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung ad 0,5 ml

II= Untersuchungsgruppe 1 = Promethazinzusatz
berechnete Volumina der Staph-Susp
+0,1 ml Promethazinlösung
+Volumenausgleich mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung ad 0,5 ml

III=Untersuchungsgruppe 2 = UV-Exposition
berechnete Volumina der Staph-Susp
+Volumenausgleich mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung ad 0,5 ml

jeweils für die Relation 10-20-30-40 Staph./NG

Ansatz I und II befanden sich in Polystyrolröhrchen, Ansatz III in silikonisierten Quarzröhrchen.
Anschließend wurden der Versuchsperson 15 ml Blut (3x5 ml in Glasröhrchen mit je 0,2 mg Heparin = Konzentration 4 mg%) aus der gestauten Kubitalvene entnommen und sofort jeweils 1 ml den vorbereiteten 12 Ansätzen zugefügt. Zur endgültigen Berechnung der Relation Staph./NG wurde die Zahl der NG im Venenblut bestimmt.

f) Inkubation und Herstellung der Präparate
Nach Zufügen des Blutes zum vorbereiteten Ansatz erfolgte nach guter Durchmischung die Inkubation in einem Wärmeschrank mit der Temperatur von 37°C. Während der Inkubationszeit von 30 min wurden die Röhrchen in einer leichten Schrägaufhängung mit ca. 52 U/min um die

Längsachse rotiert.
Ansatz I und II, die nicht dem UV-Licht ausgesetzt werden sollten, wurden zirkulär mit einer Aluminiumhülse abgedeckt, Ansatz III blieb ungeschützt.
Nach 30 min wurden Proben entnommen und dünne, gleichmäßige Ausstriche sämtlicher Ansätze angefertigt. Die Präparate wurden 24 Stunden an der Luft getrocknet und anschließend nach Pappenheim gefärbt (5 min May-Grünwald, Abspülen mit aqua bidest, 15 min Giemsa-Verd.1:20, Abspülen mit aqua bidest), noch einmal 3-4 Stunden getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

g) Auswertung der Präparate
Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Phasenkontrastmikroskop bei Anwendung von Ölimmersion und Blaufilter (Vergrößerung 1:800). Beurteilt wurden vom distalen Ende des Ausstrichs beginnend an beiden Rändern je 50 unausgewählte, intakte, solitär gelegene NG. Monocyten, eosinophile und basophile Granulocyten wurden nicht berücksichtigt.
Für jede einzelne Zelle wurde 1. die Zahl der ingestierten Staph. und 2. die Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen bestimmt.
Dabei stellten sich die Staph. als homogene, blaue, gleichmäßig große, runde Einschlüsse im Cytoplasma dar. Als cytoplasmatische Vakuolen wurden optisch leere Strukturen definiert, die sich durch die intensivere Leuchtkraft vom zum Teil degranulierten Cytoplasma abgrenzten. Bewertet wurden die Vakuolen, die mindestens einen Durchmesser von zwei Bakterien hatten.

Die Zahl der NG im Venenblut wich von der zur Berechnung des Angebots Staph./ NG im peripheren Blut bestimmten Zahl der NG ab, so daß

das tatsächliche Angebot teilweise nicht mit dem angenommenen übereinstimmte. Deshalb wurde zum Vergleich der Werte innerhalb der Gruppen und der Gruppen untereinander die Zahl der ingestierten Staph./ 100 NG und die Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen /100 NG für die Werte des angenommenen Angebots von 10-20-30 -40 Staph./NG interpoliert.
Für die Auswertung wurden Mittelwert und Standardabweichung der Zahl der ingestierten Staph. und der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen /15x100 NG jeder Gruppe errechnet und mit Hilfe des t-Testes eine Varianzanalyse der Ansätze II und III gegenüber der Kontrolle I erstellt. Dabei wurde die Signifikanz der Differenzen zwischen den Gruppen für die einzelnen Werte bestimmt.

Bei 5 unausgewählten Versuchen wurden aus den Präparaten B (= Angebot 20 Staph./ NG) aller drei Ansätze I, II und III jeweils 50 NG unselektioniert herausfotografiert (Vergrößerung 1 : 4000) und auf folgende Weise beurteilt:

- Bestimmung der Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen / 50 NG für jedes Präparat
- Berechnung der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen / 5 x 50 NG für jede Gruppe (I, II und III)
- Bestimmung der Fläche der Einzelvakuolen / 50 NG in jedem Präparat mit dem Teilchengrößenanalysator durch Messung des Durchmessers und Berechnung der Fläche
- Berechnung der Gesamtfläche der cytoplasmatischen Vakuolen / 5 x 50 NG für jede Gruppe
- Darstellung der Verteilung der Vakuolenfläche / 5 x 50 NG jeder Gruppe über der

Zählwerknummer des Teilchengrößenanalysators

- Errechnung des Mittelwerts der Fläche der Einzelvakuole / 5 x 50 NG jeder Gruppe, der Standardabweichung und Signifikanzprüfung mit Hilfe des t-Testes für die Werte der Gruppen II und III gegenüber dem Kontrollwert der Gruppe I

III. Ergebnisse

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in den Tabellen 1-4 und Abb. 1-5 dargestellt. Folgende Aussagen werden dadurch möglich: Unabhängig von den verschiedenen Maßnahmen kommt es bei steigendem Angebot des Phagocytates zur Steigerung der Ingestion und Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen.

1. Ingestion von Staph./ 100 NG
   U V - B e s t r a h l u n g steigert unter den angegebenen Bedingungen die Ingestion von Staph. durch NG signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Unter P r o m e t h a z i n zusatz dagegen bleibt die Zahl der ingestierten Bakterien im Vergleich zur Kontrollgruppe im gleichen Bereich. (Abb.1 , Tab. 1)

2. Zahl cytoplasmatischer Vakuolen
   Die Zahl cytoplasmatischer Vakuolen wird durch U V - E x p o s i t i o n signifikant gegenüber der der Kontrollgruppe gesteigert. P r o m e t h a z i n dagegen bewirkt eine signifikant verminderte Bildung cytoplasmatischer Vakuolen im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. (Abb.2 , Tab. 2)

3. Quotient cytoplasmatische Vakuolen / ingestierte Staph.
   Die Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen pro ingestiertes Bakterium zeigt unter der U V - B e s t r a h l u n g keine signifikante Abweichung von der der Kontrollgruppe, während unter P r o m e t h a z i n zusatz die Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen pro ingestiertes Bakterium gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermindert ist. (Abb. 3 , Tab. 3)

4. Bestimmung der Gesamtvakuolenfläche
Die Gesamtfläche der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen / 5 x 50 NG wird durch U V - E x p o s i t i o n um 50-70% gegenüber den Werten der Kontrollgruppe gesteigert, während unter P r o m e t h a z i n zusatz eine Verminderung um etwa 30 % gegenüber Der Kontrollgruppe beobachtet wird. (Abb. 4)

5. Bestimmung der mittleren Fläche der Einzelvakuole
Da sich unter U V - B e s t r a h l u n g auch eine Steigerung der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen / 5 x 50 NG um 50-70 % gegenüber den Werten der Kontrollgruppe findet und eine Reduktion um ca. 35 % gegenüber der Kontrollgruppe bei Einwirkung von P r o m e t h a z i n, folgt für den Quotienten Fläche der cytoplasmatischen Vakuolen in 5 x 50 NG / Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen in 5 x 50 NG jeder Gruppe ein annähernd gleicher Wert für die drei Gruppen I, II und III, das heißt, die Größe der Einzelvakuolen selbst wird durch die Inkubation unter den verschiedenen Bedingungen nicht beeinflußt. (Abb.4 , Tab. 4)

6. Flächenverteilung der cytoplasmatischen Vakuolen
Bei der Beurteilung der Verteilung der Vakuolenfläche / 5 x 50 NG zeigt sich, daß für jedes Angebot die Maxima der Durchmesser der cytoplasmatischen Vakuolen und somit der Fläche in allen drei Gruppen I-III im gleichen Intervall liegen. Die Höhe der Maxima ist abhängig von der Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen, die, wie bereits dargestellt, durch Promethazinzusatz bzw. UV-Exposition bestimmt wird. (Abb.5)

Tab. 1
Mittelwert und Standardabweichung der Zahl der ingestierten Staph. / 100 NG der Kontrollgruppe (I), der Untersuchungsgruppe mit Promethazinzusatz (II) und der Untersuchungsgruppe unter UV-Exposition (III) bei dem Angebot 10 (A), 20 (B), 30 (C) und 40 Staph. / NG (D) und Angabe der Signifikanz der Differenzen im Vergleich der Gruppen II und I wie III und I.

	I	II	III
A	317,83 ± 198,23	279,68 ± 166,04	687,65 ± 252,13
B	823,05 ± 405,77	813,52 ± 362,81	1461,43 ± 574,41
C	1362,78 ± 467,04	1358,16 ± 611,60	2479,34 ± 865,13
D	1949,28 ± 701,58	1732,80 ± 708,85	2955,41 ± 1091,86

	II-I	III-I
A	n.s.	sss
B	n.s.	ss
C	n.s.	sss
D	n.s.	ss

s: $p \leq 0,05$ ss: $p \leq 0,01$ sss: $p \leq 0,001$
n.s.: $p > 0,05$

Tab. 2
Mittelwert und Standardabweichung der Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen / 100 NG und Angabe der Signifikanz der Differenzen im Vergleich der Gruppen II und I wie III und I.
vergl. Tab. 1

	I	II	III
A	123,10 ± 35,56	59,91 ± 25,47	199,31 ± 53,11
B	172,16 ± 50,38	83,95 ± 27,39	301,73 ± 69,96
C	206,23 ± 64,24	110,37 ± 35,39	364,00 ± 118,31
D	250,31 ± 61,29	129,87 ± 52,16	419,64 ± 111,10

	II-I	III-I
A	sss	sss
B	sss	sss
C	sss	sss
D	sss	sss

Tab. 3
Quotienten der Mittelwerte der Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen und der Zahl der ingestierten Staph., vergl. Tab.1

	I	II	III
A	0,38	0,21	0,28
B	0,2	0,1	0,2
C	0,15	0,08	0,14
D	0,12	0,07	0,14

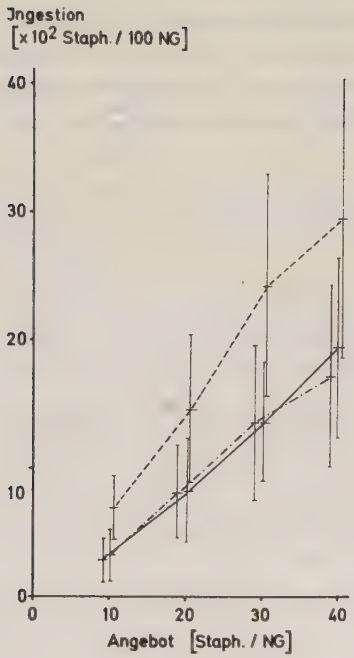


Abb. 1
Mittelwert und Standardabweichung der Zahl der ingestierten Staph. / 100 NG der Kontrollgruppe (————), der Untersuchungsgruppe unter Promethazinzusatz (-·-·-·-·-) und der Untersuchungsgruppe unter UV-Exposition (-----) in Abhängigkeit vom Angebot des Phagocytates

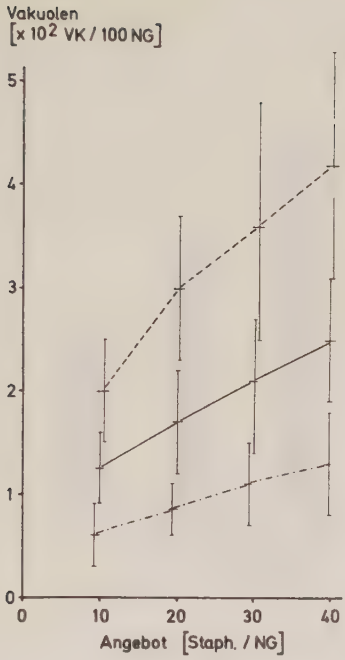


Abb. 2
Mittelwert und Standardabweichung der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen / 100 NG der Kontrollgruppe (———), der Untersuchungsgruppe unter Promethazinzusatz (-·-·-·-) und der Untersuchungsgruppe unter UV-Exposition (----) in Abhängigkeit vom Angebot des Phagocytates

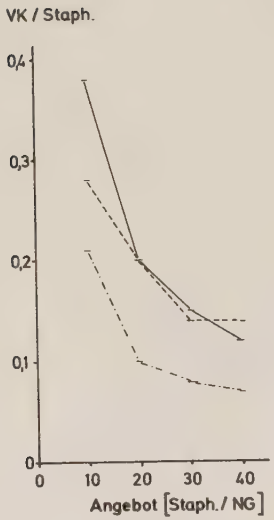


Abb. 3
Quotienten der Mittelwerte der Zahl der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen und der Zahl der ingestierten Staph. der Kontrollgruppe (———), der Untersuchungsgruppe unter Promethazinzusatz (-·-·-·-) und der Untersuchungsgruppe unter UV-Exposition (----) in Abhängigkeit vom Angebot des Phagocytates

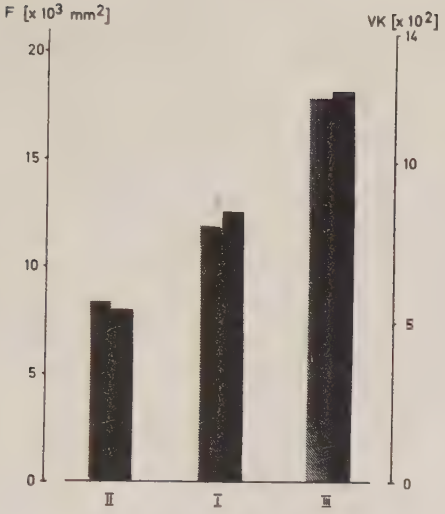


Abb. 4
Gesamtvakuolenfläche (▨) und Gesamtvakuolenzahl (■) von 5 x 50 NG der Kontrollgruppe I und der Untersuchungsgruppen II und III bei einem Angebot von 20 Staph. / NG

Tab. 4
Mittelwert und Standardabweichung der Flächen der Einzelvakuolen (in mm^2 bei Vergrößerung 1 : 4000) der Gruppen I - III und Angabe der Signifikanz der Differenzen im Vergleich der Gruppen II und I wie III und I bei einem Angebot von 20 Staph. / NG
vergl. Tab. 1 S. 14

I	II	III	II-I	III-I
13,97 ± 1,13	15,55 ± 2,05	14,82 ± 2,39	n.s.	n.s.

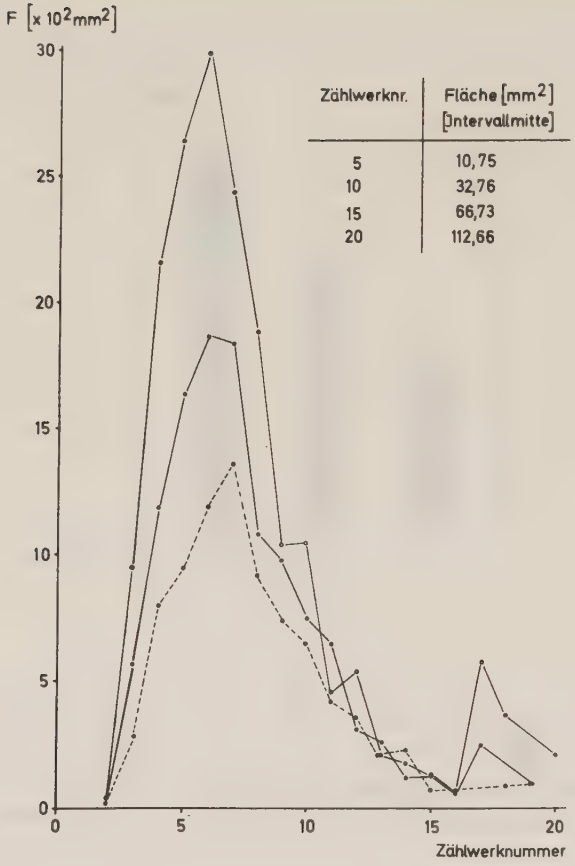


Abb. 5
Verteilungskurven der Flächen der cytoplasmatischen Vakuolen von jeweils 5 x 50 NG der Kontrollgruppe und der Untersuchungsgruppen bei einem Angebot von 20 Staph. / NG
Darstellung über der Zählwerknummer des Teilchengrößenanalysators (vergl. Beispiele in obenstehender Tabelle)

• ——— • = Kontrollgruppe
• ------ • = Untersuchungsgruppe mit Promethazinzusatz
o ——— o = Untersuchungsgruppe unter UV-Exposition

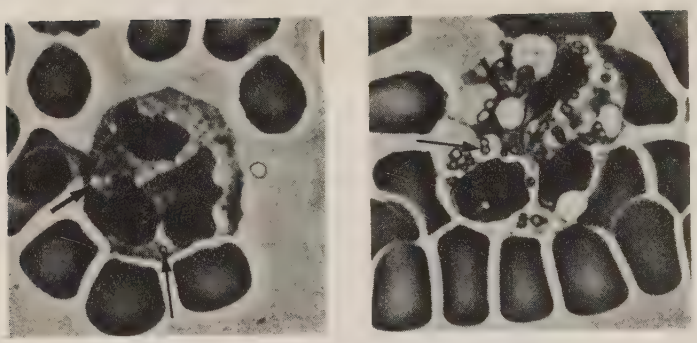
7. Morphologische Befunde

Unter den verschiedenen Bedingungen der Versuchsanordnung erscheinen die NG im Ausstrich im Lichtmikroskop unterschiedlich hinsichtlich Größe und Gestalt:

Die Leukocyten der Gruppe II (Promethazinzusatz) nehmen mit Ausnahmen eine kleinere Fläche ein und sind scharf begrenzt; das Cytoplasma erscheint kompakt, relativ dicht und einheitlich gefärbt. Die cytoplasmatischen Vakuolen sind deutlich voneinander abzugrenzen. Die NG der UV - exponierten Gruppe III nehmen teilweise eine größere Fläche im Ausstrichpräparat ein. Ihr Cytoplasma erscheint degranuliert, so daß eine Differenzierung der einzelnen cytoplasmatischen Vakuolen erschwert ist, zumal sich diese - bedingt durch ihre hohe Zahl - gelegentlich überlagern und dann nur durch die unterschiedliche Leuchtkraft abzugrenzen sind. Häufig finden sich Ansammlungen von 4 - 5 NG.

Die Bakterien sind lichtmikroskopisch extravakuolär im Cytoplasma verteilt sichtbar, vereinzelt finden sie sich auch intravakuolär. Zeichen einer Andauung oder fortgeschrittenen Verdauung der Staph. sind nicht zu erkennen.

Nach UV-Bestrahlung erscheint im Vergleich zur Kontrollgruppe ein größerer Anteil der NG im Ausstrich zerstört, während in den durch Promethazinzusatz beeinflußten Präparaten nur vereinzelt beschädigte Zellen zu finden sind.
(Abb. 6 a, b)



a) b)

Abb. 6 NG der Gruppen II und III bei einem Angebot von 20 Staph. / NG

a) Promethazinzusatz (II): zu sehen ist ein NG, der einzelne ingestierte Staph. und cytoplasmatische Vakuolen enthält.

b) UV-Exposition (III): zu sehen ist ein NG, der zahlreiche ingestierte Staph. und cytoplasmatische Vakuolen enthält.

⟶ = ingestiertes Bakterium

➞ = cytoplasmatische Vakuole

IV. Diskussion

Während der Phagocytose von Partikeln wird in NG eine vermehrte Bildung von cytoplasmatischen Vakuolen beobachtet, die als Heterophagolysosomen gedeutet werden (6). Voraussetzung dazu ist die Fusion der Membranen eines Heterophagosoms und mindestens eines primären Lysosoms und die Ausschüttung des lysosomalen Inhalts in das Heterophagosom.
Am Vorgang der Membranfusion sind verschiedene Mechanismen beteiligt, die im folgenden dargestellt werden. Allen Vorstellungen liegt der Gedanke einer primären Destabilisierung der Membranen am Ort der Fusion zugrunde.
Die Destabilisierung der Lysosomenmembran wird von verschiedenen Untersuchern durch Aktivitätsmessung der aus den isolierten Lysosomen freiwerdenden Enzyme im Überstand gemessen. Weiterhin wird von einigen Autoren das Ausmaß der Lipidperoxidation der Membranen bestimmt und als biochemisches Substrat der Membrandestabilisierung gewertet.

1. Einfluß von Promethazin und UV-Exposition

Auch Promethazin und andere Phenothiazinderivate sowie UV-Licht scheinen über verschiedene Mechanismen eine Wirkung auf den Grad der Membranstabilität auszuüben:

a) Änderung der sterischen Konfiguration der Membranen
   Lucy (14) sieht eine Erklärung für die Fusion der Membranen in einer Änderung der sterischen Anordnung der Membranbausteine derart, daß die bimolekulare Schicht der von der Plasmamembran abgeleiteten Heterophagosomenmembran zugunsten einer Ausbildung globulärer Micellen

verändert wird. Dies kann z.B. durch eine Reaktion verschiedener Substanzen mit den Lipidkomponenten der Membran hervorgerufen werden.
Lucy erläutert eine Integration von durch Phospholipase gebildetem Lysolecithin in die Membran, wodurch die Anzahl der micellaren Strukturen erhöht wird, so daß ein fingerartiges Ineinandergreifen der Membranen gefördert wird.
An Versuchen mit künstlichen Phospholipid-"Liposomen" in der Reaktion mit NG konnte gezeigt werden, daß wahrscheinlich durch die ingestierten Partikel eine Änderung der sterischen Konfiguration von Membranen erfolgt, die zur Demaskierung verschiedener polarer Gruppen der Phospholipide in der Heterophagosomenmembran führt, so daß eineInteraktion mit der Proteinkomponente der Lysosomenmembran möglich wird, die dann zur Fusion führt (9).
Weiterhin diskutiert Lucy (14) als Voraussetzung für die Fusion eine Erhöhung der Oberflächenspannung der Memoranen, woraus eine lokale Reduktion in der Stabilität der Membranen resultieren soll. Membranstabilisierende Substanzen müßten daher die Oberflächenspannung reduzieren.

Auch für die Wirkung von Phenothiazinderivaten auf Membranen werden solche Vorgänge diskutiert. Für Promethazin z.B. ist tatsächlich eine oberflächenaktive Wirkung im Sinne einer Reduktion der Oberflächenspannung nachgewiesen worden (20). Seeman (18) konnte zeigen, daß die Anzahl von Phenothiazinmolekülen, die auf der Höhe der maximalen Stabilisation oder Schutzwirkung dieser Stoffe gegenüber membrandestabilisierenden Substanzen an Erythrocytenmembranen adsorbiert werden, fast gleich ist mit der Zahl der Phospholipidmoleküle pro Zelle. Auch Lucy (14) zeigt eine direkte Interaktion von Chlorpromazin mit

Lecithin-Cholesterol. Die Lysosomenmembran ist aber mit 20 % der Zusammensetzung sehr reich an Cholesterol und somit sehr empfindlich (14,15).

b) GSH-$NADPH_2$-Peroxidase-System

Der mit dem Cytoplasma in Kontakt stehende Anteil der Lysosomenmembran soll nach Angaben von Lucy (14) leicht oxidierbare SH-Gruppen enthalten, deren Integrität durch anwesende Schutzstoffe wie reduziertes Glutathion (GSH) gewährleistet wird. Dieses GSH-System würde somit als intrazelluläres Antioxidans gegen die membrandestabilisierenden Einflüsse z.B. verschiedener Peroxide dienen (16,20).

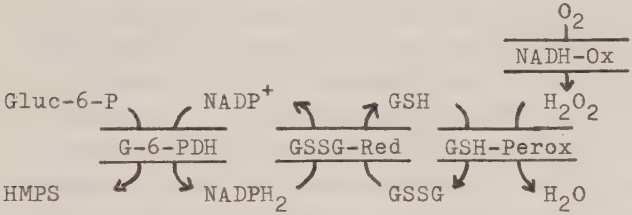


Abb.7 Schema des GSH-$NADPH_2$-Peroxidase-Systems
Gluc-6-P = Glucose-6-Phosphat, HMPS = Hexosemonophosphatshunt, GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion

Die Enzyme GSH-Peroxidase und die $NADPH_2$-abhängige GSSG-Reduktase wurden in Leukocyten nachgewiesen (1,2).
Phenothiazinderivate (50µm Chlorpromazin, 20µm Promethazin) heben eine durch Hinzufügen eines GSSG-GSH-Systems induzierte Schwellung von Mitochondrien als Ausdruck der Membrandestabilisierung auf (10). Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt.
Außerdem findet sich während der Phagocytose eine

eindeutige Erhöhung der Glucoseutilisation über den Hexosemonophosphatshunt sowie eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme und H_2O_2-Bildung (13,22). Beide Effekte werden durch Phenothiazinderivate deutlich gesenkt (4,20). (Promethazin hebt nicht nur den Anstieg des HMPS und des O_2-Verbrauchs während der Phagocytose auf, sondern verhindert auch zu 100 % die Iodination von Zymosanpartikeln in einer Konzentration von mehr als 33µm (4).)

c) Lipidperoxidation

Neben den verschiedenen Zeichen einer erhöhten Stoffwechselrate und H_2O_2-Bildung während der Phagocytose findet man eine Steigerung der Lipidperoxidation an den Membranen der Zelle (27), die u.a. durch GSH verhindert werden kann.
Die Bildung der Lipidperoxide wird besonders durch UV-Strahlen, Ozon und eine hohe Sauerstoffspannung im Medium gefördert. Es folgt daraus eine Destabilisierung der Membranen (12,22), die zum Teil auf die radiomimetischen Eigenschaften der Peroxide wie z.B. Zerstörung der SH-Gruppen zurückzuführen ist (25,26).
Das Ausmaß der Lipidperoxidation - gemessen an der Rate der Malonyldialdehydbildung - ist unter Promethazineinfluß deutlich gesenkt.(4)
Unter UV-Bestrahlung steigt das Ausmaß der Peroxidation von Mitochondrienmembranen mit der Dauer der UV-Exposition (17). Nach UV-Exposition separierter Lysosomen werden generell hohe Aktivitäten der Enzyme im Überstand gemessen (5, 19,23), was als Ausdruck stattgefundener Membrandestabilisierung, durch die es zum Austritt der Enzyme aus den Lysosomen kommt, gewertet wird.
Phenothiazine scheinen hier eine deutliche

Schutzwirkung zu besitzen. Slater beschreibt eine Herabsetzung der Lipidperoxidation um 50 % durch Promethazin (20).

d) Superoxidbildung

Während der zuletzt dargestellten Vorgänge der Lipidperoxidation entstehen zahlreiche freie Radikale. Besonders diskutiert wird die Entstehung von O_2^-, das direkt bakterizid wirkt (3,22).
Es wurde schon sehr früh vermutet, daß die UV-induzierte Steigerung der Bakterizidie durch Radikalbildung verursacht wird (8). Bei der Phagocytose von Bakterien wird die Produktion von O_2^- gesteigert (21). Ob primär H_2O_2 oder O_2^- zur Bakterizidie beitragen, ist jedoch nicht eindeutig bewiesen.
Obwohl Promethazin den bakteriellen Abtötungsvorgang unterdrückt, scheint es jedenfalls nicht direkt in die H_2O_2-Produktion einzugreifen, sondern eher mit verschiedenen reaktiven Zwischenprodukten zu reagieren (4). Slater beschreibt eine Unterdrückung der durch Bestrahlung ausgelösten lysosomalen Aktivierung durch Promethazin als "free radical scavenger" (19).

Es bleibt die Frage offen, ob nicht die beschriebenen Mechanismen der Lipidperoxidation und Superoxidbildung sowie das GSH-$NADPH_2$-Peroxidase-System Teilvorgänge eines zusammenhängenden Systems sind. Weiterhin bleibt ungeklärt, inwieweit eine Desintegration der Membran, wie sie unter a) dargestellt wurde, unter dem Einfluß dieser oxidativen Stoffwechselwege steht.

2. Eigene Ergebnisse

In der Versuchsanordnung wurde eine Konzentration von Promethazin zu 66µm gewählt. Verschiedene Autoren stellten eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Phenothiazineffekts fest: Eine erhebliche Inhibition der durch Phagocytose oder membrandestabilisierende Substanzen bewirkten Enzymfreisetzung aus separierten Lysosomen wurde für Konzentrationen von Promethazin zu 20-29-33-50µm bewiesen (4,11,20). Weissmann (24) fand einen stabilisierenden Effekt für verschiedene Phenothiazinderivate bei einer Konzentration von 10 - 1000µm. Größere Konzentrationen als 1000µm dagegen zerstörten die Lysosomenmembran. Fand (7) benutzte Konzentrationen zwischen 0,18 und 7,2 mm, die zur Enzymfreisetzung und zum Zelluntergang führten. Konzentrationen über 100µm scheinen also bereits in den toxischen Bereich der Phenothiazine zu fallen.
Es ergibt sich somit eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Membranstabilität. Konzentrationen unter 100µm scheinen jedoch sicher membranstabilisierend zu wirken. In Vorversuchen wurden von mir daher Konzentrationen von 16 - 33 - 66 µm geprüft, wobei die höchste Konzentration auch den eindeutig stärksten Effekt auf das Ausmaß der Bildung cytoplasmatischer Vakuolen hervorrief. Die Konzentrationsabhängigkeit der Bildung cytoplasmatischer Vakuolen von Promethazin in einem weiten Bereich wurde nicht untersucht.

Aus den Ergebnissen der Versuche geht hervor, daß die hauptsächliche Wirkung von Promethazin eine signifikante Herabsetzung der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen während der Phagocytose ist, wobei die Ingestion der angebotenen Staphylokokken im Vergleich zur Kontrollgruppe

annähernd gleich hoch ist. Hier scheint also eine eindeutige Beeinflussung speziell der Fusion zwischen Lysosomen- und Heterophagosomenmembran vorzuliegen. Für die Art der Einwirkung ist eine Herabsetzung der Lipidperoxidation mit Minderung der Radikalbildung, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben ist, wahrscheinlich. Der Quotient gebildete cytoplasmatische Vakuolen/ ingestierte Staphylokokken wird somit unter Promethazin signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe.
Im Gegensatz zu Untersuchungen von Eschenbach (6) habe ich gefunden, daß UV-Exposition sowohl eine Steigerung der Ingestion von Staphylokokken als auch eine signifikante Erhöhung der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen hervorruft. Rechnerisch zeigt sich das in dem mit den Kontrollwerten fast identischen Quotienten cytoplasmatische Vakuolen / ingestierte Staphylokokken. Dies läßt sich eventuell dadurch erklären, daß statt der von Eschenbach benutzten Latexpartikel Staphylokokken angeboten wurden.
Die Ergebnisse der Flächenmessung der cytoplasmatischen Vakuolen lassen bei Vergleich der Gruppen I, II und III nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede in der Fläche der Einzelvakuole erkennen. Einer Steigerung der Zahl cytoplasmatischer Vakuolen entspricht eine vergleichbar große Steigerung der Vakuolengesamtfläche.

Die Ergebnisse unter den gewählten Versuchsbedingungen lassen also erkennen, daß unter Einbeziehung des Ingestionsindex die UV-Exposition nicht sicher zu einer ingestionsunabhängigen Steigerung der Bildung cytoplasmatischer Vakuolen führt,d.h. ein direkt membrandestabilisierender Effekt auf die Lysosomenmembran ist nicht zu erkennen.

Promethazin bewirkt jedoch eine signifikant niedrigere Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen unabhängig vom Ausmaß der Staphylokokkeningestion, d.h., daß die zur Bildung cytoplasmatischer Vakuolen führende Fusion von Lysosomen mit Heterophagosomen wahrscheinlich zunächst abhängig ist vom Grad ihrer Membranstabilität und durch Promethazin im Sinne einer Membranstabilisierung direkt beeinflußt werden kann.

3. Methode

Die eigenen Untersuchungen wurden nicht, wie von den meisten Autoren beschrieben, an separierten Lysosomen ausgeführt, sondern an Vollblut. Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen erklären die Unterschiede zwischen den eigenen und den in der Literatur mitgeteilten Ergebnissen.

In den Präparaten des UV-exponierten Blutes ist ein Teil der NG zerstört, konnte also nach Definition nicht bewertet werden. Es bleibt hier die Frage bestehen, inwieweit dadurch ein negatives Ergebnis vorgetäuscht wird: diejenigen Zellen, die besonders durch die UV-Strahlen beeinflußt und somit zur Ingestion von Staph. und Bildung cytoplasmatischer Vakuolen angeregt wurden, werden beim Ausstreichen zerstört.
Es kann jedoch nicht festgelegt werden, ob diese Zerstörung artefiziell durch die Ausstrichtechnik erzeugt ist oder bereits im Vollblut stattfindet als Ergebnis einer überdimensionalen Ingestion und Bildung cytoplasmatischer Vakuolen. In jedem Fall wäre jedoch dabei eine erhöhte Fragilität der Membran Voraussetzung.

In den Präparaten der UV-exponierten Gruppe III sind die NG mit Ausnahmen größer als diejenigen der Gruppen I und II. Es ist möglich, daß es wegen der durch UV-Bestrahlung bewirkten Membranalteration unter dem Ausstreichen zu einer breiteren Haftung der Zellen am Objektträger kommt. So wurde keine Bestimmung der Gesamtfläche der NG vorgenommen und in Beziehung zur Gesamtvakuolenfläche gesetzt, sondern letztere allein berücksichtigt.

V. Zusammenfassung

In in-vitro Phagocytoseversuchen wurde die Wirkung von Promethazin und UV-Licht auf die Ingestion von Staphylokokken und die Bildung cytoplasmatischer Vakuolen der Neutrophilen Granulocyten im Vollblut untersucht. Es wurde die Zahl der ingestierten Staphylokokken und die Zahl und Fläche der gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen ausgewertet.
Dabei zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Promethazineinfluß eine deutliche Reduktion der Zahl cytoplasmatischer Vakuolen (um ca. 50 %) in den NG, während das Ausmaß der Ingestion von Staphylokokken gleich bleibt.
Unter UV-Exposition werden sowohl die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen als auch die Ingestion von Staphylokokken gegenüber den Kontrollwerten um 50-100 % gesteigert.
Die Fläche der Einzelvakuolen dagegen wird weder durch Promethazin noch durch UV-Licht signifikant beeinflußt.
Die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen wurde als Ausdruck stattgefundener Fusion zwischen Lysosomen- und Heterophagosomenmembran und somit einer Membrandestabilisierung gedeutet. Das bedeutet, daß Promethazin, unter dessen Einfluß die Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen in den NG sinkt, den Grad der Membranstabilität der an der Fusion beteiligten Organellen erhöht, während ein Effekt auf die Membranstabilität durch UV-Licht nicht abzuleiten ist, da sowohl die Ingestion von Staphylokokken als auch die Bildung cytoplasmatischer Vakuolen gesteigert werden.

VI. Literaturverzeichnis

1 Bracci,R., Calabri,G., Bettini,F., Princi,P.
Glutathione peroxidase in human leukocytes
Clin. Chim. Acta 29, 345 - 348, 1970

2 Cocchi,P., Mori,S., Ravina,A.
Myeloperoxidase-deficient leukocytes in streptococcal infections
Helv. Paediatr. Acta 28, 79 - 85, 1973

3 Curnutte,J.T., Whitten,D.-M., Babior,B.M.
Defective Superoxide Production by Granulocytes from Patients with Chronic Granulomatous Disease
N. Engl. J. Med. 290, 593 - 7, 1974

4 DeChatelet,L.R., Qualliotine-Mann,D., Caldwell,R., McCall,Ch.E., Gusdon,J.P.
Effects of Promethazine-Hydrochloride on Human Polymorphnuclear Leukocytes
Infect. Immun. 7, 403 - 408, 1973

5 Desai,I.D., Sawant,P.L., Tappel,A.L.
Peroxidative And Radiation Damage To Isolated Lysosomes
Biochim. Biophys. Acta 86, 277 - 285, 1964

6 Eschenbach,C., Seebach,G.
Zur Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen von Leukocyten im in-vitro-Versuch II
Klin. Wochenschr. 52, 688-695, 1974

7 Fand,I.
Effects of Phenothiazine Tranquillizers on Lysosomes in Cultured Human Cells
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 183,247-260,1970

8 Harris,R.S., Bunker,L.M., Milas,N.A.
J. Bacteriol. 23, 429 - 435, 1932
zit. in 21

9 Hawiger,J., Horn,R.G., Koenig, M.G., Collins,R.D.
Activation And Release Of Lysosomal Enzymes From Isolated Leukocytic Granules By Liposomes. A Proposed Model For Degranulation In Polymorphnuclear Leukocytes
Yale J. Biol. Med. 42, 57 - 70, 1969

10 Hunter,F.E., Scott,A., Weinstein,J., Schneider,A.
Effects of Phosphate, Arsenate, and other Substances on Swelling and Lipidperoxide-formation when Mitochondria are Treated with Oxidized and Reduced Glutathione
J. Biol. Chem. 239, 614 - 620, 1964

11 Hunter,F.E.Jr., Scott,A., Hoffstein,P.E., Guerra,F., Weinstein,J., Schneider,A., Schutz,B., Fink,F., Ford,L., Smith,E.
Studies on the Mechanism of Ascorbate-induced Swelling and Lysis of Isolated Liver Mitochondria
J. Biol. Chem. 239, 604 - 613, 1964

12 Johnson,B.E.
Ultraviolet Radiation and Lysosomes in Skin
Nature 219, 5160, 1258-59, 1968

13 Kvarstein,B., Seeger Halvorsen,K.
Oxygen Consumption during the Initial Stage of Human Leukocyte Phagocytosis as a Test for Chronic Granulomatous Disease
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 26, 175-178, 1970

14 Lucy,J.A.
Lysosomal Membranes
in Lysosomes in Biology and Pathology II,11
(Dingle,J.T., Fell,H.B. ed.)
Amsterdam-London 1969

15 Mason,R.J., Stossel,T.P., Vaughan,M.
Lipids of Alveolar Macrophages, Polymorphnuclear Leukocytes and Their Phagocytic Vesicles
J. Clin. Invest. 51, 2399- 2407, 1972

16 Mills, G.C.
Glutathione Peroxidase and the Destruction of Hydrogen Peroxide in Animal Tissues
Arch. Biochem. Biophys. 86, 1-5, 1960

17 Ottolenghi,A., Bernheim,F., Wilbur,K.M.
The Inhibition of Certain Mitochondrial Enzymes by Fatty Acids Oxidized by Ultraviolet Light or Ascorbic Acid
Arch. Biochem. Biophys. 56, 157 - 164, 1955

18 Seeman, Ph.
Membrane Stabilization and Expansion by Drugs
in Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten
(Deutsch,C.,Gerlach,C., Moser,K. ed.)
G. Thieme-Verlag Stuttgart 1968

19 Slater,T.F.
Lysosomes and experimentally induced tissue injury
in Lysosomes in Biology and Pathology I, 18
(Dingle,J.T., Fell,H.B. ed.)
Amsterdam-London 1969

20 Slater,T.E.
The Inhibitory Effects in vitro of Phenothiazines and Other Drugs on Lipid-Peroxidation Systems in Rat Liver Microsomes, and their Relationship to the Liver Necrosis Produced by Carbon Tetrachloride
Biochem. J. 106, 155 , 1968

21 Stossel,T.P., Mason,R.J., Smith,A.L.
Lipid Peroxidation by Human Blood Phagocytes
J. Clin. Invest. 54, 638 - 645, 1974

22 Vogt,M.T., Thomas,C., Vassallo,C.L., Basford,R.E., Gee,J.B.L.
Glutathione-Dependant Peroxidative Metabolism in the Alveolar Macrophage
J. Clin. Invest. 50,2 401- 410 , 1971

23 Weissmann,G.
Labilization and stabilization of lysosomes
Fed. Proc. 23, 1038 - 1044, 1964

24 Weissmann,G.
The effects of steroids and drugs on lysosomes in Lysosomes in Biology and Pathology I,10 (Dingle,J.T., Fell,H.B. ed.)
Amsterdam-London 1969

25 Wills,E.D., Rotblat,J.
The formation of peroxides in tissue lipids and unsaturated fatty acids by irradiation
Int. J. Radiat. Biol. 8,6 551 -567, 1964

26 Wills,E.D.
Mechanisms of Lipid Peroxide Formation in Animal Tissues
Biochem. J. 99, 667 - 676, 1966

27 Wills,E.D.
Lipid Peroxide Formation in Microsomes

VII. Lebenslauf

Am 31. Dezember 1953 wurde ich, Christa-Maria Höring, geb. Reiß, als erstes von zwei Kindern des Rektors Hubert Reiß und seiner Frau Theresia-Maria, geb. Sagemüller, geboren.
In Oberhausen-Sterkrade besuchte ich die katholische Grundschule, anschließend das Neusprachliche Sophie-Scholl-Gymnasium bis zum Abitur am 17.5.1972.
Vom WS 1972/73 an studierte ich an der Philipps-Universität Marburg Medizin. Dort legte ich am 25./26.August 1974 die Ärztliche Vorprüfung und am 29./30. März 1976 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.
Zum SS 1976 wechselte ich an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg und studierte dort drei Semester bis einschließlich SS 1977. Zum WS 1977/78 wechselte ich an die Westfälische Wilhelms-Universität Münster, legte dort im März 1978 den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung ab und absolvierte das Praktische Jahr mit dem Wahlfach Dermatologie am zugehörigen Lehrkrankenhaus Minden.
Am 18./19.4. (schriftlich) und am 11.5.1979 (mündlich) legte ich den 3. Teil der Ärztlichen Prüfung ab (Universität Münster).
Seit dem 9.3.1979 bin ich mit Herrn Emil Höring verheiratet.

VIII. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

in Marburg:

Amon, Barthelmai, Dimroth, Dittrich, Dombrowski, Eschenbach, Ganz, Gerdes, Geus, Golenhofen, Graul, Haberich, Hanelmann, Hardewig, Hensel, Hess, Hildebrandt, Hort, Ihm, Karlson, Klaus, Koransky, Kuni, Ludwig, Mannheim, Maroske, Martini, Müller, Petry, Portig, Richter, Riecken, Rodeck, Rohen, Schiff, Schmitz-Moormann, Siegrist, Stöcker, Stutte, Wendt, Wesemann, Willenbockel

in Würzburg

Engelhardt, Kern, Kley, Kühn, Leydhecker, Mertens, Röckl, Rütt, Schrappe, Schwerd, Seeliger, Ströder, Wulf, Wyss

in Münster

Bachmann, Hilgenberg, Schellong

am Lehrkrankenhaus Minden

Heinemann, Salfeld, Seckfort

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. C. Eschenbach für die freundliche Überlassung des Themas der Doktorarbeit und vor allem für seine ständige Hilfsbereitschaft danken.